第4卷第2期　　　动 物 学 研 究　　　Vol. 4, No. 2
1983年5月　　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　　May., 1983

辽宁产东亚钳蝎(Buthus martensii Karshi)毒两种毒素的纯化及其部分性质的研究

周 新 华*

（辽宁大学生物系酶学研究室）

摘　　要

用CM-Sephadex C-50分离辽宁产东亚钳蝎毒得到十二个蛋白组份，对其中的第八组份进行了CM-Sephadex C-50重层析和Sephadex G-50凝胶过滤，最后得到两种纯化的毒素。应用低pH系统不连续聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳、SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶板状电泳及等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳鉴定均为单一条带。二者的分子量和等电点分别为8,980，8,660和7.58，7.90。还测定了粗毒对小白鼠的LD50（腹腔注射）、有关酶活力和毒素Ⅰ的氨基酸组成。

试验结果还表明，用13%胶浓度的SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶板状电泳测定小于10,000道尔顿的蛋白质的分子量，可以获得较为满意的结果。

蝎毒中含有较复杂的毒性蛋白和非毒性蛋白组份。自从六十年代初Miranda小组对Buthus occitanus和Androtonus australis蝎毒中的毒蛋白进行分离纯化（Miranda et al., 1964a），并研究了毒蛋白的结构与功能以来（Miranda et al., 1964b），全世界已纯化的蝎毒毒素约有三十种左右（周新华，1982a）。这是因为蝎毒中的毒蛋白不仅含量高，种类多，分子量小和热稳定性较好，而且具有独特的生理活性，诸如，引起血压变化，心律失常，呼吸麻痹，肌肉收缩或舒张，以及增强神经膜的通透性和阻断神经传导（Tu, 1977）等等。随着现代分子生物学的迅速发展，蝎毒的毒蛋白又被作为蝎类种属进化和分类的分子依据。

虽然我国盛产的东亚钳蝎（*Buthus martensii* Karshi）一直被誉为中医的名贵药材，但是对蝎毒的研究却很少见报导。除了Iwano（1917）、久保田晴光（1918）、Mori（1917，1919）和天民加来（1950，1954）等报导过对蝎尾节浸提物的研究外，尚

* 现工作单位为沈阳药学院生化教研室　本文1981年12月17日收到，1982年11月7日收到修改稿。
志谢：本文承蒙徐长晟教授、赵忠信、夏盛强同志指导，并请任允忠、吴治成、李芳生教授帮助审阅，在氨基酸组成测定中得到中科院沈阳林土所张剑秋同志帮助，李桂亭同志协助拍摄照片，在取毒过程中得到罗元文同志帮助，在此一并致谢。

未见到其它报道。鉴于此，作者对辽宁产东亚钳蝎毒及毒中的两种毒蛋白进行了实验研究，旨在从分子水平上阐明蝎毒的部分毒理和药理机制，进而为取毒制药，临床应用和保护生态平衡提供实验依据，同时对于蛋白质结构与功能的理论研究也将有一定的意义。

材料与方法

蝎毒 东亚钳蝎（*Buthus martensii* Karshi），1981年夏采集于辽宁省朝阳地区。用电刺激法取出新鲜毒液，经真空干燥后得块状无定形灰白色固体，冰箱保存待用。

试剂 CM-Sephadex C-50，Sephadex G-50 均为 Pharmacia 产品（进口分装）；Ampholine pH3.5～10，LKB 公司产品，丙烯酰胺为 Fluka 产品，甲叉双丙烯酰胺为 Serva产品；对硝基苯磷酸二钠为E. Merck 公司产品；卵磷脂为上海禽蛋二厂产品；苯甲酰-L-精氨酰乙酯，L-亮氨酸，透明质酸均为上海生化所产品；氯化乙酰胆碱为北京化工厂产品；牛血清白蛋白（BSA）为上海牛奶公司产品；卵白蛋白（OA）为上海生化所东风试剂厂产品；细胞色素C（CYT）为上海酵母厂产品；胰蛋白酶（TRY）为 Sigma公司产品；核糖核酸酶（RNE）为Boehringer Mannhein公司产品，上述标准蛋白均为电泳纯。其他试剂均为分析纯。

实验方法与结果：

一、酶活力测定

磷脂酶A_2活力参照陈远聪等方法（陈远聪等，1981）测定。

α-淀粉酶活力参考Street等方法（Street et al.，1956）测定。

精氨酸酯酶、磷酸单酯酶、蛋白水解酶和L-氨基酸氧化酶活力均参考云南动物所四室方法（云南动物研究所，1976）测定。

乙酰胆碱酯酶活力参考Jeaniue Saunders等方法（J. Saunders et al.，1970）测定。

透明质酸酶活力参考Di Ferrante法（Di Ferrante，1956）测定。

以上八种酶活力的测定结果为，蝎粗毒溶液浓度直至 1,000μg/ml 没有测出磷酯酶A_2活力；100μg/ml，没有测出 α-淀粉酶活力；5mg/ml，没有测出精氨酸酯酶活力和磷酸单酯酶活力；6mg/ml，没有测出乙酰胆碱酯酶活力；2mg/ml，没有测出L-氨基酸氧化酶活力和蛋白水解酶活力；透明质酸酶活力为9.6单位/mg粗毒/分钟。

二、粗毒半数致死量（LD_{50}）的测定

参照《卫生统计学》（四川医学院，1975）介绍的Kärber法进行测定。每组17～21g小白鼠10只（雌雄混合编组），施行腹腔注射，注入体积为 0.2ml/10g，组间蝎毒剂量按等比级数$1/1.5^n$以生理盐水稀释，原液浓度为1.6mg/ml，共八个剂量组，并以生理盐水做对照，根据24小时内的死亡率计算LD_{50}为10.3μg/g。

三、毒性测定（冉永禄等1981）

小白鼠每组3只，将柱层析后的各组份适当稀释到相同浓度后进行腹腔注射，注射体积为0.2ml/10g，以相应的缓冲液为对照，观察24小时内各组的死亡率。蛋白含量按“蛋白浓度（毫克/毫升）$=1.45D_{280}-0.74D_{260}$”公式计算。

四、蝎毒素的分离纯化

1.CM-Sephadex C-50 柱层析（图 1）

用蒸馏水将CM-Sephadex C-50 凝胶膨润后，以 pH5.4 0.02M 磷酸缓冲液把胶的pH调至5.4，然后装柱（85×0.9cm），用缓冲液平衡。用1.2ml缓冲液对50mg干毒三次提取，并分别离心（11,000×g）15分钟（20°C以下）。将三次获得的上清液混合，除留0.01ml毒液测蛋白含量外，其余上柱。洗脱分三步：（1）缓冲液洗脱；（2）收集 16 管后加 NaCl直线梯度洗脱，搅拌瓶为120ml磷酸缓冲液，贮存瓶为含 0.5M NaCl 的磷酸缓冲液120ml；（3）88管后加第二次NaCl直线梯度洗脱。搅拌瓶为80ml含0.5M NaCl的磷酸缓冲液，贮存瓶为80ml含 1.0M NaCl 的磷酸缓冲液。洗脱液用部分收集器收集，每管 3ml，15分钟接一管，收集的洗脱液蛋白浓度对管数作图，并计算每次柱层析的蛋白回收率，测定各个峰的生物活性。结果共得12个峰，其中11，12峰有透明质酸酶活力，8,9峰对小白鼠呈致死活力，其毒性分别为2/3和3/3。

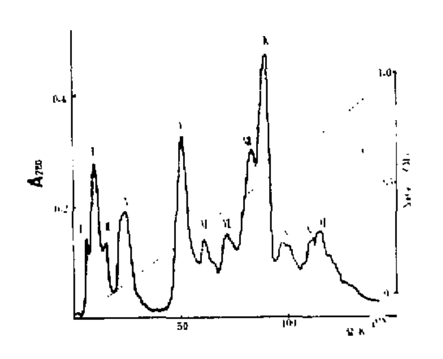


图 1　羧甲基葡聚糖C—50柱层析图谱

2.CM-Sephadex C-50重层析（图 2）

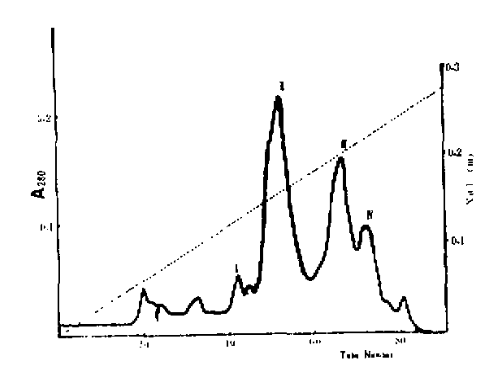


图 2　羧甲基葡聚糖凝胶C—50重层析图谱

将第八组份装透析袋在 4°C对 0.02M pH5.4 磷酸缓冲液透析脱盐后，重新上柱（21.5×1.3cm），用缓冲液洗至无蛋白流出，然后加NaCl直线梯度洗脱。搅拌瓶为200 ml磷酸缓冲液，贮存瓶为200ml含0.5M NaCl的磷酸缓冲液。每22分钟接一管，每管接3ml，按上法计算蛋白回收率，并测各峰的致死活性，所得的四个蛋白峰中，Ⅰ、Ⅱ峰对小白鼠的致死毒性为3/3。

3.Sephadex G-50凝胶过滤（图 3～4）

将重层析所得有毒组份分别透析脱盐冷冻干燥成干粉后，用 0.02M pH5.4 磷酸缓

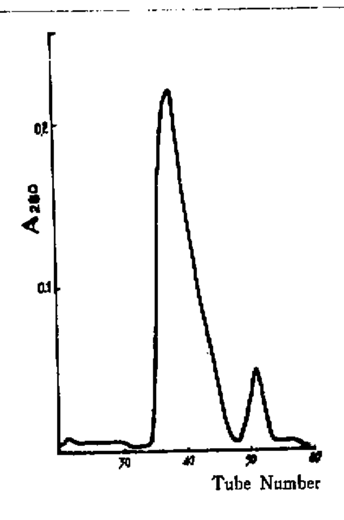


图3 Toxin Ⅰ Sephadex G50凝胶过滤图谱

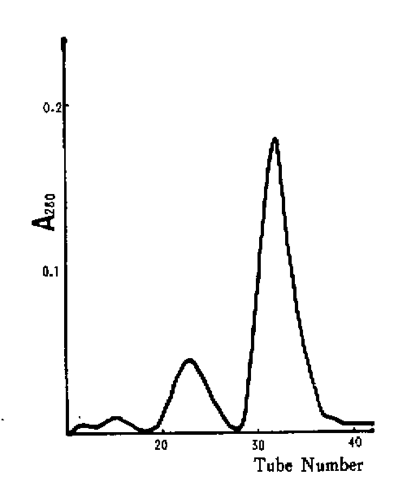


图4 Toxin Ⅱ Sephadex G50凝胶过滤图谱

冲液溶解，体积均为1 ml。Sephadex G-50凝胶用上述缓冲液充分溶涨后装柱（105×1.3cm），然后分别上样。洗脱液21分钟收集一管，每管3ml。毒素Ⅰ收集在25～35管，毒素Ⅱ收集在27～34管。在4°C对蒸馏水透析、冷冻干燥后，即得纯化的蝎毒素Ⅰ、Ⅱ两种蝎毒素均无上述各种酶活力。当蛋白浓度（按毒性测定一式计算）稀释至0.164mg/ml（注射剂量为3.3μg/g）时，对小白鼠的致死毒性测定均为3/3，这一剂量与粗毒比较，毒性提高9.1倍。

纯化的蝎毒素Ⅰ产率为2.7～3.0%，蝎毒素Ⅱ产率为1.7～1.9%。

五、纯度鉴定

1.pH4.5聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳（莽克强，1975）

分离胶，交联度C＝2.6%，凝胶浓度T＝7.7%，以pH4.3醋酸缓冲液配胶，浓缩胶，C＝2.6%，T＝3%，以pH6.7醋酸缓冲液配胶。电极缓冲液为β－丙氨酸—醋酸pH4.5缓冲液。上槽接正极，下槽接负极。

样品50微克溶于含有0.1%甲基绿的10%蔗糖溶液20微升中，控制电流每管1毫安，待样品进入分离胶后，恒定电流每管3毫安，电压100伏，电泳时间为3小时。电泳完毕后剥出凝胶，先用12.5%三氯醋酸固定30分钟后，水洗几遍，用0.25%考马斯亮兰R－250（甲醇，冰醋酸，水＝45：10：45V/V配制）染60分钟后，用脱色液（含有7.5%的冰醋酸和10%甲醇的水溶液）脱色。

2.pH8.9 SDS－不连续聚丙烯酰胺凝胶板状电泳（莽克强等，1975）

分离胶，C＝2.6%；T＝13%，以pH8.9Tris-HCl缓冲液加0.1%SDS配胶。浓缩胶，C＝2.6%，T＝3%，以pH6.7 Tris-HCl缓冲液加0.1%SDS配胶。电极缓冲液为pH8.3含0.1%SDS的甘氨酸—Tris缓冲液。上槽接负极，下槽接正极。

样品20微克，用含2%SDS，4%巯基乙醇，10%甘油，0.001%溴酚兰的稀释10倍

电极缓冲液40微升溶解后，沸水浴加热两分钟后加样。控制电流15毫安，电压50伏，待样品进入分离胶后，将电流恒定至30毫安，电压 100 伏。电泳时间为 3 小时。除染色时间为30分钟外，蛋白的固定、染色，脱色与纯度鉴定 1 条件相同。

3.聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦圆盘电泳（莽克强，1975）

凝胶 C＝2.6％ T＝ 5 ％，加入 2 ％Ampholine（pH3.5～10）。电极溶液，上槽为0.4％乙醇胺，接负极；下槽为0.2％硫酸，接正极。

样品100微克溶于含有 2 ％Ampholine（pH3.5～10）及 10％ 蔗糖溶液中，以溴酚为蓝指示染料。控制电压为 600 伏， 4 °C电泳 3 小时。电泳完毕取出凝胶在四色染色液（武祥福等，1981）（亮绿:溴酚蓝:考马斯亮蓝:罗丹明 B＝10:20:1:1W/W， 5 ％的HAC配制）中染色10分钟，于脱色液（同上）中脱色。

粗毒在pH4.5圆盘电泳显12条带，在SDS-凝胶电泳和等电聚焦电泳分别显示14～16条带，而两种毒素在上述三种类型的电泳中均呈现一条区带，从而证明这两种毒素均为电泳纯蛋白（图 5 ～图 7 ）。

六、分子量测定

用 SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶板状电泳法测定。两种毒素及标准蛋白（牛血清白蛋白67,000；卵白蛋白43,000；胰蛋白酶23,300；核糖核酸酶13,700；细胞色素 C11,700)各 20 微克，样品处理及电泳条件均同纯度鉴定 2 。然后以电泳Rf对蛋白质分子量的对数作图（图 8 ）；求得毒素 I 的分子量为8,980；毒素 II 为8,660。

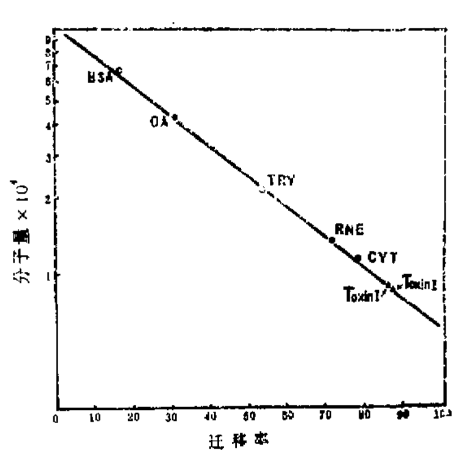


图 8　毒素 I 、II 的分子量测定

七、等电点测定

制7.5cm 胶柱四根，预电泳半小时后，将毒素 I 、II 各 100 微克分别加入两根胶柱进行等电聚焦。胶浓度、样品配制和电泳条件同纯度鉴定 3 。另两根胶柱不加样品，电泳完毕，从阴极到阳极以0.5cm 长度切下分别装入小试管，加 100μl 蒸馏水，冰箱放置12小时，用自制微电极（雷克健，1981）测定位置与蛋白带相对应的无样品胶柱的 pH 值，从而得到毒素 I 、II 的等电点分别为7.58和7.90。（图 9 ）

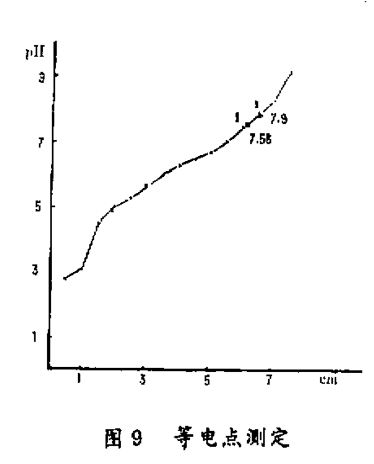


图 9　等电点测定

八、氨基酸组成分析

称取蝎毒素 I 0.313mg，溶于 5.7 N HCl 中，真空封管，110°C水解 24 小时，开管后蒸去盐酸，用日立 835 型氨基酸自动分析仪定量

测定。从SDS不连续聚丙烯酰胺凝胶板电泳测定的分子量与测定的氨基酸组成值求得相应的倍数换算成相比的分子比，结果如表1。

九、紫外吸收光谱测定

用蒸馏水分别将少量的毒素Ⅰ、Ⅱ溶解后，用781型分光光度计测定紫外吸收光谱，以蒸馏水为对照。试验结果表明两种毒素均在280nm处有一个最大吸收峰，在260nm处无吸收峰。故二种毒素均不含核酸。

表 蝎毒素的氨基酸组成

氨基酸	试验值	计算值	氨基酸	试验值	计算值
Asp	10.96	11	Val	4.66	5
Thr	1.24	1	Ile	2.77	3
Ser	3.04	3	Leu	1.77	2
Glu	4.49	4	Tyr	3.38	3
Ala	5.32	5	Lys	6.54	7
Gly	11.81	12	Phe	1.63	2
Met	0.00	0	His	0.5	1
Arg	2.99	3	1/2Cys	6.21	6
Trp	ND*		Pro	2.89	3
氨基酸总数		72	分子量		8,915

*ND：代表未测定

讨　论

蝎毒不同于蛇毒，它是一种蛋白种类较多但酶蛋白种类较少的混合物。辽宁产Buthus martersii Karshi蝎毒八种酶活力的测定结果表明该蝎毒类似*T. serrlatus* (Possani et al., 1976), *C. limpidus teconlanus* (Possani et al., 1980)和*C. noxius* (Myran et al., 1979) 蝎毒，只有透明质酸酶活力。久保田晴光（1918）曾报导辽宁东亚钳蝎尾节浸提物有溶血能力，我们用粗毒也重复得出这一结果，这表明溶血活性与磷脂酶A_2的作用似乎不存在直接关系，而可能与其它因子有关。

东亚钳蝎毒对小白鼠的半数致死量为10.3μg/g（腹腔注射），其毒力可居已知LD_{50}蝎毒的第七位，因而是毒力较弱的一种蝎毒。

纯化后的两种蝎毒素经三种系统聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定均为单一组份，是无酶活性的碱性蛋百质。毒素Ⅰ的氨基酸组成分析表明有三对半胱氨酸，无甲硫氨酸，富含天冬氨酸和甘氨酸，是由72个氨基酸残基所组成的蛋白质。与国外报导的近三十种蝎毒蛋白相比，天冬氨酸和甘氨酸较多，半胱氨酸少一对，这可能说明该毒素的稳定性和毒性要稍低一些。这两种毒素分子量均在8,500道尔顿以上，故是蝎毒素中分子量较大的蛋白质。由于两种毒蛋白的分子量差别不大，而且等电点相近，其生理功能存在哪些特性和差异，以及两种毒蛋白的活性部位、结构与毒性的关系如何，尚待今后进一步探讨。

通常认为用SDS电泳方法测定小于10,000道尔顿的蛋白质的分子量误差较大，故在国内外很少见这方面报导，Possani等人曾用SDS-连续聚丙烯酰胺凝胶电泳技术测定已纯化的一种蝎毒素的分子量（Possani et al., 1980），发现电泳测得结果与氨基酸组成测定结果竟相差1,130～2,030道尔顿(误差为±15～28%)。在本实验中，作者采用13%胶浓度的SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶板电泳方法测定已纯化的毒素Ⅰ、Ⅱ的分子量。结果表明，这种电泳方法不但浓缩效应好，分辨率高，而且标准蛋白间线性关系明显，易于比较，误差小。电泳测得毒素Ⅰ的分子量与氨基酸定量分析所得分子量误差为±0.7～1.6%（按国外文献和电泳法分子量测定数据推算，当色氨酸为1时，氨基酸组份计算值与所得分子量差65道尔顿，色氨酸为2时，则相差140道尔顿）可见用13%胶浓度的SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶板状电泳测定范围在8,000～10.000道尔顿的蛋白质的分子量可以取得较满意的结果。

本文分离纯化蝎毒素的条件与国外不同，结果表明用羧甲基葡聚糖凝胶比纤维素更易获得较纯的蝎毒素，即能分出较多的蛋白峰且重复性好，因而是分离蝎毒素可提倡的方法。

本文纯化的毒素Ⅰ、Ⅱ仅是东亚钳蝎毒中毒素的一部分，作者曾用CM-Sephadex C-50对第一次层析所得第九组份重层析，还可分出3—4个有毒组份；另外，该毒的透明质酸酶活力远远高于睾丸和一些蛇毒中该酶的活力；最近，Chhatwal等人（1980）还报告了从印度红蝎毒中分离纯化了胰蛋白抑制剂并研究了它的部分性质，这些都提示尚有着广泛而需要进一步研究的课题有待于今后去解决。

参 考 文 献

云南动物所四室 1976 蛇毒的研究与利用Ⅰ.我国几种常见毒蛇的酶活力测定．生物化学与生物物理学报 8:151

四川医学院1978《卫生统计学》．人民卫生出版社87.

冉永禄等 1981 福建圆斑蝰蛇（*Vipera russelli siamensis*）蛇毒磷脂酶A_2的分离纯化及部分性质的研究．动物学研究 2（增刊）：3.

周新华 1982 蝎毒．生物化学与生物物理进展 4:25.

陈远聪等 1981 蝮蛇毒突触前神经毒素的纯化及其生化性质的进一步研究．生物化学与生物物理学报 13:205.

武祥福等1981浙江蝮蛇碱性磷脂酶A的分离纯化及其性质的研究 动物学研究 2（增刊）:12.

莽克强等 1975 聚丙烯酰胺凝胶电泳．科学出版社.

雷克健 1981 一种简易的复合微电极．生物化学与生物物理进展 2:79.

久保田晴光 1918 On the toxicity of the venom of the Mexican (Durango) scorpions compared with that of the Chinese scorpion. *J. Pharm. Exper. Therap.* Ⅱ, 447.

Chhatwal, G. S. 1980 Isolation and partial characterization of a trypsin inhibitor in the venom of the Indian red scorpion (*Buthus tamulus*). *IRCS Med. Sci. Biochem.* 8:517.

Di Ferrante 1956 Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J. Bio. Chem.* 22:303.

Jeaniue, Saunders et al. 1970 *Hadrus arizonensis* venom: A new source of acetylcholinesterase. *Ame. J. Tro. Medi. Hygi.* 19:345.

Miranda et al. 1964 a I. Purification des neurotoxins (scorpamines) d' *Androctonus Austrlis* (L) et de *Buthus cocitanus* (Am), *Toxicon.* 2:51.

Miranda et al. 1964b Ⅱ. Determinations preliminaries aus etudes de structure sur les neurotoxins (scor-

pamines)d'*Androctonus australis* (L) et de *Buthus occitanus* (Am). Toxicon. 2:123.
Myran A. R. et al. 1979 Purification and characterzation of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Cetruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon.* 18:343.
Possani, L. D. et al. 1976 Purifification and properties of mammalian toxins from the venom the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Arch. Biochem. Biophy.* 180:394.
Possani, L. D. et al. 1980 purification and characterization of a mammalian toxin from venom of the Mexican scorpion *Centruoides limpidus tecomanus* Hoffmann, *Toxicon.* 18:175.
Street, H. V. et al. 1956 Determination of amylase activity in biological fluids. *Clin. Chim. Acta* 1:252.
Tu, A. T. 1977 In: *Venoms.* P. 459 (Tu, A. T., Ed) New York: *John Wiley*

THE ISOLATION, PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF TWO TOXINS FROM THE SCORPION VENOM OF *Buthus martensii Karshi* FROM LIAONING

Zhou Xin hua

(Department of Biology, Liaoning University)

The crude venom of scorpion *Buthus martensii* Karshi (from Liaoning) was fractionated into 12 protein peaks on CM-Sephadex C-50. Two toxins were purified from the eighth fracton by rechromatography on CM-Sephadex C-50 and gel filtration on Sephadex G-50. Their homogeneties were demonstrated by polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing electrophoresis and SDS-polyacrylamide gel slab electrophoresis. The molecular weight of the toxins, calculated from measurement in SDS- Discontinuous polyacrylamide gel slab electrophoresis, are 8,980 and 8,660 respectively. Their isoelectric points are 7.58 and 7.90 respectivey by isoelectric focusing electrophoresis. The amino acid composition of the toxin I was determined.

The crude venom showed hyaluronidase activity but no phospholipase A_2, α-amyase, arginine esterase, acetylcholinesterase, phosphomonoesterase, L-amino acid oxidase as well as proteinase activity. The LD50 of crude venom of scorpion *Buthus martensii* Karshi was found to be 10.3μg/g for mice.

The protein of molecular weight less than 10,000 dalton could be determined by SDS-disc polyacrylamide gel slab electrophoresis (13%). The results obtained were more satisfactory.